



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101793894 A

(43) 申请公布日 2010.08.04

(21) 申请号 200910045733.6

(22) 申请日 2009.02.03

(71) 申请人 王武康

地址 200060 上海市普陀区梅川路 1333 弄  
55 号 504 室

(72) 发明人 王武康 徐基芳 王文卓

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

一种检测甲羟孕酮的直接竞争酶联免疫测定试剂盒

### (57) 摘要

本发明属生物医药领域。公开一种检测甲羟孕酮的直接竞争酶联免疫测定试剂盒。本发明提供甲羟孕酮抗原合成方案,首先用甲羟孕酮合成甲羟孕酮-3-羧甲基肟,后者在碳二亚胺催化下,用 N-羟基丁二酰亚胺活化,与牛血清白蛋白结合,合成免疫原;与辣根过氧化物酶结合,合成酶标抗原。用免疫原,免疫新西兰大白兔,获得甲羟孕酮多抗。测定时,用羊抗兔多抗(二抗)包被酶标板,二抗与甲羟孕酮多抗结合,洗涤后加入样品或甲羟孕酮标准和酶标抗原,显色测定,就可得出结果。本发明试剂盒中配制的各试剂,使用方便。这为食品安全,药物检测中,甲羟孕酮的检测,提供一个快速,特异,灵敏和准确的检测方法。

1. 本发明公开一种测定甲羟孕酮的直接竞争酶联免疫试剂盒。

其特征包括：免疫原的制备，酶标抗原的制备，抗体制备和试剂盒各组份的配制及酶标板的包被。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于，合成甲羟孕酮免疫原的方法。用甲羟孕酮溶于无水吡啶，搅拌下，加入羧甲基羟胺，甲羟孕酮与羧甲基羟胺的摩尔比为 1 : 1.5 左右，室温搅拌 24 小时后，减压抽干吡啶，得黄色油状物。加乙酸乙酯溶解，用蒸馏水洗三次，分离出有机相。加热减压去乙酸乙酯近干，加乙醚，置冰箱，得白色沉淀。为甲羟孕酮-3-羧甲基肟，再与 N-羟基丁二酰亚胺反应，用二环己碳二亚胺 (DCC) 或水溶性碳二亚胺 {1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺；1-环己-3-(2-吗啉-4-乙基)碳二亚胺-对甲基苯亚磺酸盐} 催化，得甲羟孕酮-3-羧甲基肟活化物，该活化物与载体蛋白在碱性条件下，与载体蛋白上氨基相联，为甲羟孕酮的免疫原。载体蛋白如：牛血清白蛋白，卵清蛋白，甲状腺球蛋白，大钥匙孔状碱血蓝蛋白。

3. 根据权利要求 1-2 所述，其特在于，合成一种酶标抗原的方法：用甲羟孕酮-3-羧甲基肟活化物，在碱性条件下与酶相联，其酶可为：辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶， $\beta$ -半乳糖苷酶。

4. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于，试剂盒溶液的优化配制。标准溶液和样品的配制，是用含 0.1%~0.5%水杨酸钠和 0.05%~0.1%吐温-20 的 0.1~0.01M 的磷酸盐缓冲溶液。

抗体稀释液用含 0.1~0.5%明胶的 0.1~0.01M 磷酸盐缓冲溶液。

显色液为二组份，其中，一组份为显色缓冲液，由磷酸氢二钠和柠檬酸组成，每毫升含 0.2~0.5 $\mu$ l 30%  $H_2O_2$ ；另一组份为四甲基联苯胺 (TMB) 液。TMB 液用 95%乙醇或二甲亚砜配制成 1mg/ml 浓度。

5. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒，其特征在于，用采用羊抗兔抗体 (二抗) 包被 96 或 48 孔酶标板。用 2%卵清蛋白液封闭孔中未吸附二抗的部位。

6. 一种用直接竞争酶联免疫测定方法，测定各种样品中甲羟孕酮的方法。其特征在于：

(1) 样品的前处理方法。用溶剂抽提方法，大大简化了测定过程。

(2) 用权利要求 1-5 所述工艺组装的试剂盒测定，检测过程为：

用包被有羊抗兔抗体的酶标板，加入甲羟孕酮抗体，孵育后洗涤甩干，加入标准或样品溶液和酶标抗原 (甲羟孕酮-辣根过氧化物酶)，孵育后洗涤甩干，加显色剂显色，终止，测定。标准或样品甲羟孕酮浓度的对数值与  $OD_{450}$  值呈反比。以此达到定量测定甲羟孕酮的目的。此直接竞争酶联免疫测定试剂盒，检测范围为 0.1~20ng/ml，灵敏度可达 0.08ng/ml。

## 一种检测甲羟孕酮的直接竞争酶联免疫测定试剂盒

[0001] 技术领域 本发明属生物医药技术领域,药物检测,食品安全检测试剂。具体而言,本发明利用免疫反应的高灵敏性和特异性,以及酶促反应的放大效应和易检测性,建立起来的一种检测甲羟孕酮的直接竞争酶联免疫测定试剂盒

[0002] 背景技术 醋酸甲羟孕酮 (Medroxyprogesterone acetate, MPA) 是一种人工合成的孕酮衍生物,又称安宫黄体酮,其孕激素活性为孕酮的 10 ~ 30 倍。与之类似的孕酮衍生物尚有甲地孕酮 (Megestrol acetate),氯地孕酮 (Chlormadinoneacetate) 等,该类化合物统称为乙酰化的促孕剂。医学上用来避孕,治疗痛经,功能性闭经,先兆流产等。在养殖业上,该类化合物有加速动物生长,增加饲料利用率的作用,故曾作为饲料添加剂。但甲羟孕酮等易在动物体内贮留,人食用有这类化合物残留的食品,有引起性功能紊乱,肝肾功能损害,甚至于诱发肿瘤等潜在性危害。故世界各国都明文禁止在饲料中添加该类物质。我国也将甲羟孕酮作为“食品动物饲料中禁用的兽药及化合物”。

[0003] 现今有关甲羟孕酮的检测方法,多采用气相色谱-质谱联用 (GC-MS),液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 或多级联用技术如 LC-MS-MS,其设备要求高,技术难度大,对技术人员要求也高。本发明利用酶联免疫测定原理,定量检测动物组织,粪便,胆汁,尿液中的甲羟孕酮残留,是一种不需要昂贵的仪器投入,一般中等文化水平的人员,经过短期培训,就可掌握的检测方法。该试剂盒检测多种样品中的甲羟孕酮,为食品中和临床医学中甲羟孕酮检测,提供了一种高效,快速,特异的检测方法。

[0004] 发明内容 本发明提供一种快速检测甲羟孕酮的酶联免疫试剂盒。其制备的甲羟孕酮试剂盒,线性范围为 0.1ng/ml ~ 20ng/ml,  $IC_{50}$  为 1.9ng/ml 左右,灵敏度为 0.08ng/ml。稳定期在 6 个月以上 (4℃冰箱保存)。

[0005] 本发明公开免疫原的合成,动物的免疫,特异性抗体的制备,试剂盒的调试和装配,试剂盒各种参数的确定及样品的前处理和测定方法。

[0006] 甲羟孕酮,化学名:17 $\beta$ -羟-19-去甲基-雄甾-4-烯-3-酮。缩写为 MPA,分子量 274.4,为小分子物质,不具有免疫原性而仅具有免疫反应性,生产甲羟孕酮的酶联免疫测定试剂盒,必须要制备对甲羟孕酮有高度特异性的抗体。

[0007] 要获得对甲羟孕酮有高度特异性的抗体,首要条件是要有一个能激发动物产生抗体的抗原。因此,免疫原的制备最为重要。其解决的方案是甲羟孕酮共价连接上一个大分子物质,通常是与一种蛋白质交联。常用的有牛血清白蛋白,卵清蛋白,甲状腺球蛋白,大钥匙孔状械血蓝蛋白等,本发明公开一种制备甲羟孕酮免疫原的方法。首先用一羟胺化合物,羧甲基羟胺,修饰 MPA,生成甲羟孕酮-3-羧甲基脒 (MPA-3-CMO),后者与 N-羟基丁二酰亚胺反应,用二环己碳二亚胺 (DCC) 或水溶性碳二亚胺 {1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺;1-环己-3-(2-吗啉-4-乙基)碳二亚胺对甲基苯亚磺酸盐} 催化,使之活化,然后与载体蛋白分子中游离胺基相连,生成甲羟孕酮免疫原。

[0008] 有了免疫原,第二步就是用免疫原免疫动物,本发明是免疫 1.5 ~ 2kg 大小的新西兰雌性家兔,获得对甲羟孕酮有特异性反应的多克隆抗体。本发明提供一种能产生高滴度抗体的免疫方案。

[0009] 为了检测特异性抗体,建立直接竞争酶联免疫测定,必须合成甲羟孕酮与一种酶交联的抗原-酶交联物(酶标抗原),交联的酶包括:辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶, $\beta$ -半乳糖苷酶等。本发明公开一种合成甲羟孕酮与酶交联的方法,以制备酶标抗原。

[0010] 在以上基础上,组装检测试剂盒。用聚苯乙烯 96 孔或 48 孔酶标板,包被二抗。(选用羊抗兔抗体,有商品供给。一般选用效价高,效价在 1 : 1000 ~ 2000 以上、稳定性好的二抗。)

[0011] 优化包被浓度,抗体浓度,酶标抗原浓度,使之达到检测要求。

[0012] 本发明提供组成试剂盒相关试剂的配制及组装流程:

[0013] (1) 用选购的二抗包被酶标板。(2) 孵育后洗涤去未吸附上的多余二抗。(3) 用另一种蛋白封闭板上未吸附二抗的多余位点,以减少测定时的非特异性吸附。(4) 提供甲羟孕酮抗体和甲羟孕酮-酶交联物(酶标抗原)浓缩液。(5) 提供抗体和酶标抗原应用稀释液。(6) 提供浓缩洗涤液(7) 提供甲羟孕酮的标准液,用样品制备液配制 7 个标准:0ng/ml,0.1ng/ml,0.5ng/ml,1.0ng/ml,5.0ng/ml,10.0ng/ml,20.0ng/ml(8) 提供酶显色缓冲溶液和酶底物液,本试剂盒所用的酶底物为  $H_2O_2$  和四甲基联苯胺(TMP), $H_2O_2$  配于显色缓冲溶液中,四甲基联苯胺(TMP)单独配制。(8) 提供酶反应终止液,终止液为 2M 硫酸。(9) 提供样品制备液。为配制甲羟孕酮标准和测定时样品的制备。

[0014] 以上试剂均放 4℃ 冰箱保存。

[0015] 应用本试剂盒检测甲羟孕酮的检测步骤:

[0016] (1) 按照测定样品数和制作标准曲线所需孔数(每样品和标准均作二个孔),从冰箱取出所需用的孔条,放置使温度平衡至室温(25℃)。

[0017] (2) 将甲羟孕酮抗体浓缩液用抗体稀释液按 1 : 100 稀释后,每孔加 100  $\mu$  l,加盖,室温放置 30 分钟。

[0018] (3) 将浓缩洗涤液用双蒸馏水按 1 : 9 稀释后,作为洗涤液,倒去孔中抗体液,用洗涤液洗涤 3 次,每孔,每次 250  $\mu$  l,每次加洗涤液后,静置 3 分钟,倒掉,甩干,再进行下一次洗涤。最后一次洗涤,尽量将液体甩掉。

[0019] (4) 各孔加入标准或样品,各标准和样品各加 2 孔,每孔加 50  $\mu$  l。将酶标抗原浓缩液,用抗体稀释液按 1 : 100 稀释后,每孔加 50  $\mu$  l。另取 2 孔,加 0 标准 50  $\mu$  l 和抗体稀释液 50  $\mu$  l 作为空白孔,稍平行振荡酶标板,混匀各孔中液体。加盖,室温放置 30 分钟。

[0020] (5) 同(3)洗涤各孔,最后甩干。

[0021] (6) 各孔加显色液 100  $\mu$  l,显色液由显色缓冲液与 TMB 液组成,临用时以 10 : 1 配制(即 1000  $\mu$  l 显色缓冲液加 100  $\mu$  l TMB 液)。加入后,加盖,室温暗处避光放置 15 分钟。

[0022] (7) 每孔加终止液 50  $\mu$  l,混匀,于 30 分钟内,用酶标仪,在波长 450nm 下,测定其光密度。

[0023] 用各孔的  $OD_{450}$  减去空白孔的  $OD_{450}$ ,得各孔的实际测定值。求出二平行孔的平均值,得各标准或样品的测定值。按照下式求出各标准和样品的抑制率:

[0024] 各标准或样品的抑制率% =

[0025] (各标准或样品的测定值 / 0 标准的测定值)  $\times$  100%

[0026] 用各标准浓度的对数值为 X,其相应的抑制率为 Y,在坐标轴上作图,得甲羟孕酮

浓度的半对数坐标标准曲线,在标准曲线上,找出样品抑制率相对应的 X 轴上的点,就可计算出样品中甲羟孕酮的浓度。现已有 ELISA 计算的相关软件,利用这些软件,只要输入测定值,立即就可得出结果。

[0027] 本试剂盒所用的检测方法,属直接竞争酶联免疫测定方法。96 孔酶标板已预先包被了二抗,加入甲羟孕酮的特异性抗体,此抗体与二抗结合后,固定在酶标板上。然后,加入标准抗原或含有甲羟孕酮的样品,和酶标-甲羟孕酮,标准或样品中甲羟孕酮与酶标-甲羟孕酮,共同竞争与甲羟孕酮抗体结合,经孵育后,洗涤去未结合的酶标-甲羟孕酮,显色测定。测定值与标准或样品中甲羟孕酮量的对数值呈反比,以此达到定量测定甲羟孕酮的目的。

### 附图说明

[0028] 图 1 为用此试剂盒测定所作的甲羟孕酮标准曲线。

[0029] 以下具体实施方式,可进一步了解本发明。此处仅提供一种优选方法,但对本发明的内容和权利要求不构成任何限制。

[0030] 实施例 1 甲羟孕酮免疫原和酶标抗原的合成

[0031] 1.1 甲羟孕酮-3-羧甲基肟 (MPA-3-CMO) 的合成

[0032] 称取甲羟孕酮 83mg (0.3mmol) 溶于 1ml 无水吡啶,搅拌下,加入 45mg (0.45mmol) 羧甲基羟胺,室温搅拌约 24 小时 (中途取样,硅胶薄层层析鉴定,直到肟化完全时停止.),减压抽干吡啶,得黄色油状物。加 2ml 乙酸乙酯溶解,用蒸馏水洗三次,分离出有机相。加热减压去乙酸乙酯近干,加 3ml 乙醚,置冰箱,得白色沉淀。离心,将沉淀干燥,此为甲羟孕酮-3-羧甲基肟,得约 40mg。溶解于 1ml DMF,用硅胶薄层层析 (TLC) 鉴定。TLC 图中,MPA-3-CMO 留在原点,而 MPA 则离开原点,随层析液前移。

[0033] 1.2 甲羟孕酮-3-羧甲基肟的活化

[0034] 上制备的甲羟孕酮-3-羧甲基肟 DMF 液,加入 40mg DCC (约 0.2mmol),4℃ 搅拌下,加入 NHS 23mg (约 0.2mmol),避光 4℃ 搅拌过夜。次日,离心去沉淀。上清为活化的甲羟孕酮-3-羧甲基肟 (MPA-3-CMO)。

[0035] 1.3 免疫原:甲羟孕酮-牛血清白蛋白 (MPA-BSA) 的合成称取 BSA 50mg 加 2000  $\mu$ l PH8 ~ 9 的蒸馏水和 2000  $\mu$ l DMF 溶解,4℃ 搅拌下,加入活化的 MPA-3-CMO 500  $\mu$ l。4℃ 搅拌过夜。次日,取出用 0.01M PBS (pH7.5) 透析 3 日。每天换 2 次透析液。透析后,定蛋白浓度,并用 uv 扫描鉴定,计算交联率。此法交联率一般在 15 ~ 20 左右。

[0036] 1.4 酶标抗原:MPA-辣根过氧化物酶 (MPA-HRP) 的合成

[0037] 称取 HRP 10mg 加 500  $\mu$ l PH8 ~ 9 的蒸馏水和 500  $\mu$ l DMF 溶解,4℃ 搅拌下,加入活化的 MPA-3-CMO 100  $\mu$ l。4℃ 搅拌过夜。次日,取出用 0.01MPBS (pH7.5) 透析 3 日。每天换 2 次透析液。透析后,过 Sephadex G 25 柱,收集有色峰。为合成的酶标抗原:MPA-辣根过氧化物酶 (MPA-HRP)。

[0038] 实施例 2 甲羟孕酮多克隆抗体的生产

[0039] 用 3 只新西兰长耳雌兔,每只兔免疫 4 次。首次用免疫原 MPA-BSA 配成 1mg/ml 浓度,取 3ml,加 3ml 弗氏完全佐剂,充分乳化后。每只兔用 2ml (即 1mg 免疫原) 于兔背部,多点皮下注射为首次免疫。以后分别在第 21 天,51 天,91 天再免疫 3 次。第 21 天,51 天,

用 3ml 1mg/ml 浓度的免疫原,加 3ml 弗氏不完全佐剂乳化,每只兔用 1ml,于臀部肌肉二侧注射.第 51 天免疫后 10 天,采血检查抗体产生情况.第 91 天,免疫原用 0.9%氯化钠液配成 0.5mg/ml 溶液,每只兔从耳静脉注射 1ml 免疫原.此次后,第 10 天,就可从兔耳静脉或心脏收获血液.收集血液让其自然凝结.离心收集血清,此为抗甲羟孕酮的多克隆抗体.

[0040] 按照此免疫方案,一般都能收获高滴度的多克隆抗体。

[0041] 用二抗包被酶标板,利用合成的酶标抗原 (MPA-HRP),测定多克隆抗体效价.生产的抗血清效价可达 10 万以上.用可按 1 : 10000 ~ 1 : 20000 稀释用.

[0042] 实施例 3 优化试剂盒组成,确定各试剂最终浓度

[0043] 用方阵法确定包被二抗,MPA 多抗,MPA-HRP 三者的最佳浓度。

[0044] 3.1 包被酶标板:二抗配成 1mg/ml 浓度,用 0.01M 碳酸盐缓冲溶液 (pH9.6) 按 1 : 1000 (1000  $\mu$ l 缓冲液加 1  $\mu$ l 二抗) 稀释后,每孔加 100  $\mu$ l,加盖,放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜.次日用洗涤液洗 3 次,最后一次甩干后,每孔加 200  $\mu$ l 封闭液,封闭液为含 2% 卵清蛋白的 0.01M 碳酸盐缓冲溶液 (pH9.6)。加入后,加盖,放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜.次日用洗涤液洗 3 次,最后一次甩干后,将酶标板放入 37 $^{\circ}$ C 烘箱 30 分钟,烘干.取出后用铝箔真空包装。

[0045] 3.2 配抗体浓缩液:以制备 MPA 多抗,1 : 1500 稀释 (用抗体保存液)。测定时用抗体稀释液按 1 : 100 稀释应用。

[0046] 3.3 配 MPA-HRP 浓缩液:合成的 MPA-HRP,用酶保存液,按 1 : 10 稀释。

[0047] 测定时用抗体稀释液按 1 : 100 稀释应用。

[0048] 3.4 配浓缩洗涤液:0.5M PBS 液 (pH7.2)+0.5% 体积的 Tween-20 为洗涤液。

[0049] 用时用蒸馏水或去离子水按 1 : 9 稀释用。

[0050] 3.5 配抗体稀释液:为 0.1M PBS (pH7.2) 加 0.1% 明胶。

[0051] 3.6 配样品配制液:为 0.1M PBS (pH7.2) 加 0.1% 水杨酸钠加 0.05% 吐温 -20。

[0052] 3.7 配制 MPA 标准:用样品配制液配.共配制 7 个标准:0ng/ml,0.1ng/ml,0.5ng/ml,1.0ng/ml,5.0ng/ml,10.0ng/ml,20.0ng/ml。

[0053] 3.8 配制显色液:显色液由二部份组成,一是“显色缓冲液”,另一是“TMB”液。显色缓冲液:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.84g+柠檬酸 0.47g+H<sub>2</sub>O 100ml+30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ l,

[0054] TMB 液:用 95% 的乙醇或用二甲亚砜配成 1mg/ml 浓度。

[0055] 3.9 配终止液:2M 硫酸。浓硫酸按 1 : 8 用水稀释则可。

[0056] 3.10 试剂盒组成:

[0057] (1) 已包被二抗的 96 孔或 48 孔酶标板 (真空铝箔包装)

[0058] (2) MPA 标准:7 个标准:0ng/ml,0.1ng/ml,0.5ng/ml,1.0ng/ml,5.0ng/ml,10.0ng/ml,20.0ng/ml

[0059] (3) MPA 抗体浓缩液 (用时按 1 : 100 稀释应用)

[0060] (4) MPA-HRP 浓缩液 (用时按 1 : 100 稀释应用)

[0061] (5) 抗体稀释液

[0062] (6) 显色缓冲液

[0063] (7) TMB 液

[0064] (8) 终止液。

[0065] (9) 10X 洗涤液

[0066] (10) 样品制备液。

[0067] 实施 4 样品处理和测定

[0068] 4.1 测定样品的处理：

[0069] 尿样：2ml 新鲜尿液加 2ml 0.1M 醋酸盐缓冲溶液 (pH4.8)，加 40  $\mu$ l 蜗牛酶液，6ml 蒸馏水，37℃ 保温 4 小时，酶解。然后，沸水浴加热 5 分钟。离心，取上清 1ml 加 4ml 正己烷，旋转混合抽提 10 分钟。离心，取上有机相 2ml，N<sub>2</sub> 气吹干，残渣加 200  $\mu$ l 样品制备液，旋转混合。室温平衡 30 分钟，作样品测定液。

[0070] 组织样品：1g 组织样品加 5ml 匀浆液 (0.9% 氯化钠 + 0.1% 水杨酸钠)，匀浆。然后，沸水浴加热 5 分钟。匀浆液定容为原体积。离心，取上清 1ml 加 4ml 正己烷，旋转混合抽提 10 分钟。离心，取上有机相 2ml，N<sub>2</sub> 气吹干，残渣加 200  $\mu$ l 样品制备液，旋转混合。室温平衡 30 分钟，作样品测定液。

[0071] 尿样品的稀释系数和组织样品稀释系数均为 2。

[0072] 4.2 样品和标准液的测定：按照说明书第 4,5 页所述的检测步骤，用组装好的试剂盒进行测定。

[0073] 测定所得标准品数据如下：

[0074]

标准浓度 (ng/ml)	0	0.1	0.5	1	5	10	20	空白
OD <sub>450</sub>	<b>2.027</b>	1.903	1.514	1.271	0.756	0.512	0.358	0.052
	<b>2.112</b>	1.919	1.553	1.278	0.761	0.535	0.364	0.081
平均值	<b>2.065</b>	1.911	1.534	1.275	0.758	0.523	0.361	0.066
测定值	<b>1.999</b>	<b>1.845</b>	<b>1.468</b>	<b>1.209</b>	<b>0.692</b>	<b>0.457</b>	<b>0.295</b>	
抑制率		0.923	0.734	0.605	0.346	0.228	0.148	

[0075] 所绘的标准曲线如图 3 所示。IC<sub>50</sub> = 1.9ng/ml

[0076] 实施 5 试剂盒的各参数

[0077] 试剂盒的特异性及交叉反应：

[0078] 甲羟孕酮 100%

[0079] 甲地孕酮 60%

[0080] 氯地孕酮 60%

[0081] 孕酮 < 2%

[0082] 氢化可的松 < 2%

[0083] 准确度：用 0.5ng/ml 标准做 24 个孔，重复测定。计算“板内变异”CV = 4.6% “板间变异” < 15%。灵敏度为 0.08ng/ml。

[0084] 精确度：用尿做回收试验，分别添加 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml 其回收率分别是：73%，86%，及 83%

[0085] 试剂盒稳定性：

[0086] 热稳定性试验，置试剂盒于 37 度，放 3 周，相当于 4 度保存 7.4 个月。其 0 标准和各标准的光密度下降 25% 左右。但其趋势不变。可见试剂盒的稳定期在半年以上。

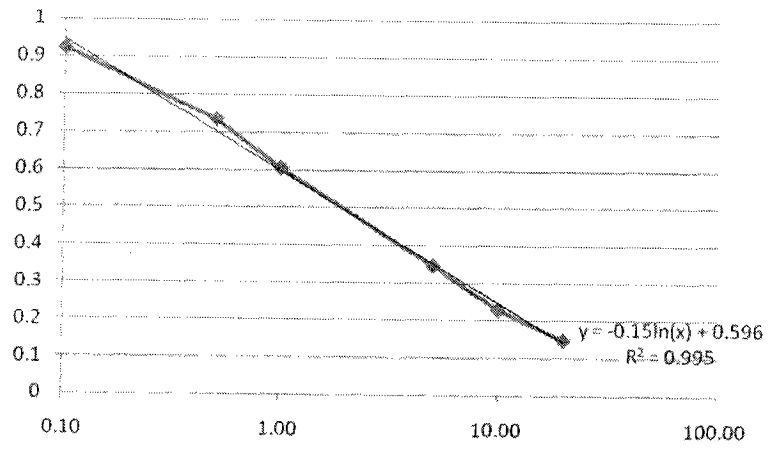


图 1

专利名称(译)	一种检测甲羟孕酮的直接竞争酶联免疫测定试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101793894A</a>	公开(公告)日	2010-08-04
申请号	CN200910045733.6	申请日	2009-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	王武康		
申请(专利权)人(译)	王武康		
当前申请(专利权)人(译)	王武康		
[标]发明人	王武康 徐基芳 王文卓		
发明人	王武康 徐基芳 王文卓		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/535 G01N33/543		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属生物医药领域。公开一种检测甲羟孕酮的直接竞争酶联免疫测定试剂盒。本发明提供甲羟孕酮抗原合成方案，首先用甲羟孕酮合成甲羟孕酮-3-羧甲基肟，后者在碳二亚胺催化下，用N-羟基丁二酰亚胺活化，与牛血清白蛋白结合，合成免疫原；与辣根过氧化物酶结合，合成酶标抗原。用免疫原，免疫新西兰大白兔，获得甲羟孕酮多抗。测定时，用羊抗兔多抗(二抗)包被酶标板，二抗与甲羟孕酮多抗结合，洗涤后加入样品或甲羟孕酮标准和酶标抗原，显色测定，就可得出结果。本发明试剂盒中配制的各试剂，使用方便。这为食品安全，药物检测中，甲羟孕酮的检测，提供一个快速，特异，灵敏和准确的检测方法。

标准浓度 (ng/ml)	0	0.1	0.5	1	5	10	20	空白
OD <sub>450</sub>	2.027	1.903	1.514	1.271	0.756	0.512	0.358	0.052
	2.112	1.919	1.553	1.278	0.761	0.535	0.364	0.081
平均值	2.065	1.911	1.534	1.275	0.758	0.523	0.361	0.066
测定值	1.999	1.845	1.468	1.209	0.692	0.457	0.295	
抑制率		0.923	0.734	0.605	0.346	0.228	0.148	